# 栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的抑制效应

于彩虹[1], 艾 东[1], 梁晓贺[1,3], 王振波[2], 郭建军[4], 姜 辉[5], 林荣华[5,*]

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100091; 2. 山东省龙口市农业技术推广中心, 山东龙口 265701;
3. 中国农业科学院农业信息研究所, 北京 100081; 4. 德州市农业科学研究院, 山东德州 253015;
5. 农业部农药检定所, 北京 100125)

**摘要**:【目的】研究一种植物源化合物栗精碱对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 5 龄幼虫中肠组织可溶型海藻糖酶的活体和离体抑制效果,初步探索其抑制作用。【方法】经过离子交换层析和疏水层析从棉铃虫 5 龄幼虫中肠组织分离纯化得到可溶型海藻糖酶,通过凝胶过滤层析确定其分子量。分别用不同浓度的抑制剂进行离体和活体抑制研究,得出栗精碱对可溶型海藻糖酶的抑制率和抑制中浓度($IC_{50}$),并采用 Lineweaver-Burk 和 Dixon 作图法分析抑制类型。【结果】棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶比活力为 2.022 U/mg,回收率为 67.57%,纯化倍数为 23.84,分子量约为 67 kDa。离体抑制研究表明,3.75, 7.5, 15 和 30 μmol/L 的栗精碱对可溶型海藻糖酶的抑制率分别为 42.00%, 50.30%, 58.32% 和 67.33%;抑制中浓度($IC_{50}$)为 7.32 μmol/L。通过 Lineweaver-Burk 和 Dixon 作图法,确定栗精碱是棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的一种有效的竞争性抑制剂,Ki 值为 4.9 μmol/L。活体抑制研究表明,分别注射浓度为 30, 15 和 7.5 μmol/L 栗精碱 10 和 20 h 后,棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶活性被显著抑制($P<0.05$)。相应地,注射后随着时间的延长,血淋巴海藻糖含量连续增加。而注射栗精碱 20 h 后,血淋巴葡萄糖浓度显著下降,使棉铃虫的能量供给出现障碍。【结论】结果表明,栗精碱是棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶的一种有效的抑制剂,可为下一步开发有效的棉铃虫杀虫剂提供理论支持。

**关键词**: 棉铃虫; 海藻糖; 海藻糖酶; 抑制剂; 栗精碱; Lineweaver-Burk 法

**中图分类号**: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)03-0301-08

# Inhibitory effects of castanospermine on soluble trehalase from the midgut tissues of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuiadae)

YU Cai-Hong[1], AI Dong[1], LIANG Xiao-He[1,3], WANG Zhen-Bo[2], GUO Jian-Jun[4], JIANG Hui[5], LIN Rong-Hua[5,*] (1. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100091, China; 2. Center of Agricultural Technique Extension of Longkou City, Longkou, Shandong 265701, China; 3. Agricultural Information Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 4. Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou, Shandong 253015, China; 5. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

**Abstract**:【Aim】The objective of the present study is to investigate the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of castanospermine, a plant-derived chemical, on the soluble trehalase 1 (Harmtre1) from midgut tissues of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* and the inhibition mechanism.【Methods】Crude Harmtre1 protein in the midgut tissues of the 5th instar larvae of *H. armigera* was isolated and purified by

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171912, 30671393)

作者简介: 于彩虹, 女, 1973 年 4 月生, 山东龙口人, 博士, 教授, 研究方向为生物化学和环境评价, E-mail: caihongyu2013@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: linronghua@agri.gov.cn

收稿日期 Received: 2015-12-25; 接受日期 Accepted: 2016-02-04

ion exchange chromatography and hydrophobic chromatography. Molecular weight of the obtained Harmtre1 protein was determined by gel filtration chromatography. Different concentrations of castanospermine were employed to determine the *in vivo* and *in vitro* inhibition rate and median inhibitory concentration ($IC_{50}$) on trehalase. The type of inhibition was determined with Lineweaver-Burk's and Dixon's mapping methods. 【Results】 The specific activity of enzyme, recovery rate, purification factor and the molecular weight of Harmtre1 was 2.022 U/mg, 67.57%, 23.84 and 67 kDa, respectively. The *in vitro* inhibition assay showed that the inhibition rates of Harmtre1 by 3.75, 7.5, 15 and 30 μmol/L of castanospermine were 42.00%, 50.30%, 58.32% and 67.33%, respectively. And the median inhibitory concentration ($IC_{50}$) was 7.32 μmol/L. According to the results of Lineweaver-Burk's and Dixon's mapping methods, castanospermine was an effective competitive inhibitor of Harmtre1 with an inhibitory constant (Ki) of 4.9 μmol/L. The *in vivo* inhibition assay indicated that the Harmtrel activity was markedly inhibited by 30, 15 and 7.5 μmol/L of castanospermine at 10 and 20 h after injection ($P < 0.05$). Correspondingly, the content of lymphal Harmtre1 increased constantly with time after injection. Nevertheless, the concentration of lymphal glucose decreased significantly and the energy supply of *H. armigera* became disordered at 20 h after injection of castanospermine. 【Conclusion】 Castanospermine is an effective inhibitor of Harmtre1. Our results will supply a theoretical support to the development of effective insecticides in control of *H. armigera* in the future.

**Key words**: *Helicoverpa armigera*; trehalose; trehalase; inhibitor; castanospermine; Lineweaver-Burk method

海藻糖作为一种非还原性二糖,是多数昆虫体内的循环糖。在昆虫体内海藻糖由 α,α-海藻糖酶特异性地水解成两分子葡萄糖,葡萄糖进一步通过糖酵解途径及三羧酸循环彻底氧化分解,从而为昆虫代谢提供能量(Thompson, 2003)。除此以外,海藻糖还是细胞内能量变化的监控者(Temesvari *et al.*, 1996)。海藻糖酶在昆虫能量代谢过程中具有重要作用,能通过代谢海藻糖进而影响昆虫生长发育。抑制昆虫体内海藻糖酶活性可抑制昆虫的能量供给,甚至可影响昆虫的几丁质合成,导致昆虫无法蜕皮而死亡(Asano *et al.*, 1990)。昆虫中的海藻糖酶具有可溶型和膜结合型两种形态。可溶型海藻糖酶游离于细胞质中,主要分布在中肠组织的杯状细胞腔内(Mitsumasu *et al.*, 2005)和血淋巴组织中(Vaandrager *et al.*, 1989);而膜结合型海藻糖酶主要分布在飞行肌、卵巢细胞(Wegener *et al.*, 2003)、中肠组织细胞表面的微绒毛和基体外侧膜上(Capella *et al.*, 1997)。除了存在于基体外侧膜上的海藻糖酶,其余的都是真正的消化酶。而中肠基部的海藻糖酶主要作用是催化血淋巴组织的海藻糖(Terra and Ferreira, 1994)。

虽然海藻糖在低等生物的能量代谢中起到重要作用,但是在哺乳动物(包括人类)体内并不能合成海藻糖。这为开发对人类健康相对安全的新型农药提供了靶标。由于传统化学农药的过度使用导致了害虫耐药性上升,水体食品污染等不良后果,急需研制对靶标生物高效、对非靶标生物安全、在产品中无残留、易分解且分解产物对环境无害的新型农药。研究发现,一些植物源化合物具有类似效果,如毒性 β-葡萄糖苷类化合物(Silva *et al.*, 2006; 于彩虹等, 2011)和糖苷生物碱(Hirayama *et al.*, 2007)对海藻糖酶都有很好的离体和活体抑制效果。植物源化合物来源于自然而且种类相当丰富,其中很多天然植物源化合物可以直接用作杀虫剂或作为模板来设计新型的杀虫剂。从澳洲豆荚 *Castanospermum australiae* 种子中提取的栗精碱属于吲哚里西啶生物碱(Hohenschutz *et al.*, 1981),是含氮的海藻糖类似物。含有一个哌啶与吡咯环稠合而成的氮杂双环,其六元环中心的构型与葡萄糖的构型一致。过去主要将栗精碱作为抗病毒药物进行研究(Walker *et al*,1987),后发现其可以竞争性抑制多种葡萄糖苷酶(Winchester and Fleet, 1992),并且在昆虫和哺乳动物体内的抑制模式不同(Scofield *et al.*, 1995)。虽有研究表明,栗精碱(1, 6, 7, 8-tetrahydroxyoctahydroindolizine)对 α-葡糖苷酶、β-葡糖苷酶(Saul *et al.*, 1983)、中性葡糖苷酶(Pan *et al.*, 1983)及蔗糖酶(Trugnan *et al.*, 1986)都有一定的抑制作用。但是,关于其对昆虫海藻糖酶抑制效果的研究较少(Asano *et al.*, 1996; Hirayama *et al.*, 2007; Forcella *et al.*, 2010),也缺乏深入分析。

本研究选取栗精碱作为一种海藻糖酶生物碱类抑制剂，研究其对棉铃虫中肠组织可溶性海藻糖酶的抑制作用，探索抑制机理，为以昆虫海藻糖酶为靶标的特异性杀虫剂研发提供理论支持，并为进一步阐述海藻糖酶活性位点反应机制提供帮助。

# 1　材料和方法

## 1.1　供试昆虫

棉铃虫 *H. armigera* 5 龄幼虫由农业部农药检定所环境室人工饲养，培养温度 25 ~ 28℃、相对湿度 50% ~70%、光周期 14L: 10D。

## 1.2　活体抑制试验

**1.2.1**　试验材料制备：用注射法处理幼虫（Kono *et al.*, 1993, 1994），使用微量注射器向幼虫的背腔部位注射。试验组：向 5 龄棉铃虫血淋巴组织注射 10 μL浓度分别为 7.5，15 和 30 μmol/L 的栗精碱（Fermentek Ltd.）；对照组：注射 10 μL 双蒸水。每浓度 3 次重复，每重复处理 24 头幼虫。试虫在人工智能气候培养箱中分别培养 10 和 20 h（培养温度 25 ~ 28℃、相对湿度 50% ~70%、光周期 14L: 10D。参照 Wegener 等（2003）和 Silva 等（2004）的方法提取中肠组织：选取 24 头幼虫先用水冲洗并用滤纸吸净水，再将幼虫放在冰上冷冻 15 min 麻醉，置于冰盘上固定后将整个肠道全部取出，去除肠道内由围食膜包裹的食物，将中肠部分取到预冷的 125 mmol/L NaCl 溶液中透析，进一步去除其中过量的蔗糖，将透析后的中肠于滤纸上迅速吸干，放入离心管于 -85℃超低温冰箱中备用。

**1.2.2**　游离型海藻糖酶比活力测定：游离型海藻糖酶活性根据葡萄糖的生成量测定。采用 Silva 等（2006）改进的方法：将供试的幼虫组织置于预冷的玻璃匀浆器中，加 3 倍体积 0.025 mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）匀浆，离心机 4℃ 12 000 g离心 30 min，取上清液为酶液。取 300 μL 酶液和 500 μL 底物（7 mmol/L 海藻糖含 60 μmol/L $MnCl_2$）置于 30℃反应 15 min，沸水浴 5 min 终止反应。反应混合物于 4℃下 8 700 g 离心 15 min，取上清液用葡萄糖氧化酶试剂盒（利德曼公司）测定葡萄糖的生成量。每组样品重复测定 3 次。

蛋白含量测定：蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝染料法（Bradford, 1976），用牛血清白蛋白作为标准来测定，采用 SHIMADZU UV-2550 紫外用分光光度计在 595 nm 处读取 OD 值。每组样品重复测定 3 次。

酶比活力以 μmol glu/mg pro · min 表示。

## 1.3　离体抑制试验

**1.3.1**　试验材料制备：参照 1.2.1 节活体实验材料制备方法提取 5 龄棉铃虫幼虫中肠组织。

**1.3.2**　游离型海藻糖酶纯化：游离型海藻糖酶的纯化根据 Silva 等（2006）改进的方法：取 96 头 5 龄棉铃虫中肠组织，加入 4 mL 双蒸水，冰浴匀浆，匀浆液 21 000 g 离心 30 min，收集上清为粗酶液，在 0.45 μm 滤膜上过滤后备用。滤液于 HipTrap Q FF 层析柱中上样 2 ~ 3 次，流速为 1 mL/min。层析柱预先用 20 mmol/L Bis-Tris 起始缓冲液，pH 7.0 平衡。用含有不同浓度（0 ~ 1 mol/L）NaCl 的洗脱缓冲液（含不同浓度 NaCl 的起始缓冲液）进行洗脱，收集用 0.3 mol/L NaCl 洗脱缓冲液洗脱后的流出液，加入 $(NH_4)_2SO_4$ 直至酶液浓度为 1.7 mol/L；样品在 4℃ 8 000 g 下离心 15 min，收集上清液进行疏水层析。上清液于 HiTrap Butyl FF 层析柱中上样［层析柱预先用含 1.7 mol/L $(NH_4)_2SO_4$，20 mmol/L Bis-Tris 缓冲液，pH 7.0 平衡］，用 1.7 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 进行洗脱，收集前 3 mL 流出液为海藻糖酶纯化酶液。测定收集池中海藻糖酶的活性，蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝染料法（Bradford, 1976）。酶液蛋白通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分离纯度和蛋白分子量。

**1.3.3**　栗精碱对可溶性海藻糖酶离体抑制率、抑制中浓度（$IC_{50}$）测定：将纯化的可溶型海藻糖酶和不同浓度范围（3.75 ~ 30 μmol/L）的栗精碱以 1∶1（v/v）的比例 30℃预热 5 min，然后与 3 倍体积底物（底物过量）30℃反应 15 min，余下参照可溶性海藻糖酶活性测定方法。对照组为底物、缓冲液和酶液三者混合物；实验组为底物、抑制剂和酶液混合物。通过公式［（对照组酶活力 - 实验组酶活力）/对照组酶活力 × 100%］计算抑制率。以抑制剂终浓度的自然对数值为横坐标，剩余酶活性的百分数为纵坐标，进行线性回归，由直线方程确定 $IC_{50}$ 值。

**1.3.4**　栗精碱对可溶性海藻糖酶抑制类型及 Ki 值的测定：为了获取 Ki 值，纯化的海藻糖酶在不同底物浓度下（1 ~ 7 mmol/L）分别和不同浓度的栗精碱（0 ~ 0.02 mmol/L）反应，用 Lineweaver-Burk 作图法，在不同抑制剂浓度［I］下，以 1/V-1/［S］作图，以不同曲线的相交情况判定抑制剂的抑制类型；用 Dixon 作图法，绘制不同［S］浓度下 1/V-［I］，各线的交点横坐标的绝对值即是 Ki。

### 1.4 数据分析

加入各浓度栗精碱后海藻糖酶活性变化数值采用一般线性模型进行方差分析,对方差分析显著的数据进一步采用 LSD 进行多重比较,检验不同酶活性间的差异。所有数据分析均在 SPSS 12.0 软件上进行。

## 2 结果

### 2.1 棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶纯化结果

棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶的纯化结果见表 1,纯化海藻糖酶活性占到总活性的 71%。从中肠组织粗提取的可溶型海藻糖酶酶液需要经过离子交换层析和疏水层析 2 步层析过滤。经过第 1 步 HipTrap Q FF 层析柱,酶液回收率为 88%,纯化倍数为 5.59 ± 0.12。经过第 2 步 HiTrap Butyl FF 层析柱,酶液的最终回收率为67.57%,最终纯化倍数为 23.84,此时纯化的可溶性海藻糖酶比活力为 2.022 ± 0.0211 U/ mg 蛋白。

纯化的酶液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,得到一条分子量约为 67 kDa 的清晰条带,证明已经分离得到了纯度较高的可溶型海藻糖酶蛋白。

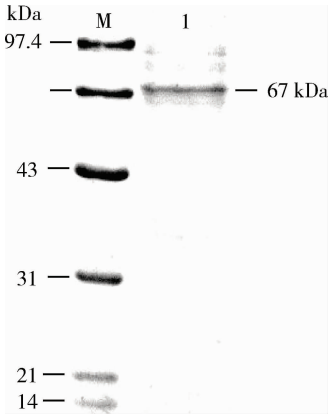


图 1 纯化后棉铃虫 5 龄幼虫海藻糖酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretogram of the purified trehelase from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

M: 标准蛋白质分子量 Protein molecular weight marker; 1: 纯化后的海藻糖酶 Purified trehalase.

**表 1 棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶纯化结果**

**Table 1 Purification results of midgut soluble trehalase from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera***

| 步骤 Step | 总蛋白含量(mg) Total protein content | 总酶活性(U) Total enzyme activity | 酶比活力(U/mg) Specific activity of enzyme | 回收率(%) Recovery rate | 纯化倍数 Purification fold |
|---|---|---|---|---|---|
| 粗酶 Crude enzyme | 1 618.39 ± 1.47 | 137.24 ± 1.57 | 0.0848 ± 0.0011 | 100 | 1.00 |
| HipTrap Q FF 层析柱 HipTrap Q FF chromatography column | 254.98 ± 1.31 | 120.86 ± 1.32 | 0.474 ± 0.0221 | 88.06 | 5.59 |
| HiTrap Butyl FF 层析柱 HiTrap Butyl FF chromatography column | 187.5 ± 1.03 | 92.73 ± 1.02 | 2.022 ± 0.0211 | 67.57 | 23.84 |

### 2.2 栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的离体抑制

栗精碱对纯化的棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶离体抑制实验表明,离体抑制随栗精碱添加浓度增高,抑制效果显著。浓度为 3.75, 7.5, 15 和 30 μmol/L 的栗精碱对可溶型海藻糖酶的抑制率分别为 42.00%, 50.30%, 58.32% 和 67.33%。抑制中浓度($IC_{50}$)为 7.32 μmol/L(图 2)。通过 Lineweaver-Burk 和 Dixon 作图法,得到栗精碱是棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的一种竞争性抑制剂(图 3 和 4),Ki 值为 4.9 μmol/L。

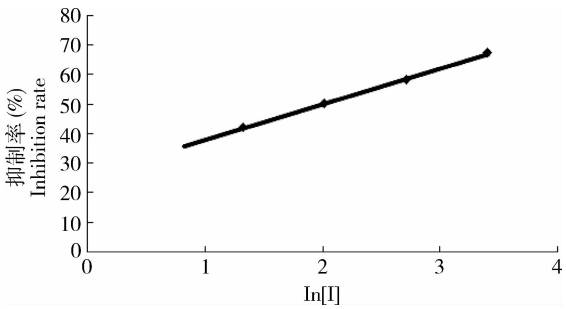


图 2 栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫可溶型海藻糖酶抑制中浓度($IC_{50}$)

Fig. 2 Inhibitory medium concentration ($IC_{50}$) of castanospermine on the soluble trehelase extracted from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

### 2.3 栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的活体抑制

**2.3.1** 对中肠组织海藻糖酶影响:栗精碱对棉铃虫幼虫中肠组织可溶型海藻糖酶活体抑制效果随着时间和注射浓度的不同呈现相似的趋势(图 5)。抑制效果随着抑制剂浓度的增加而增强。注射不同浓度

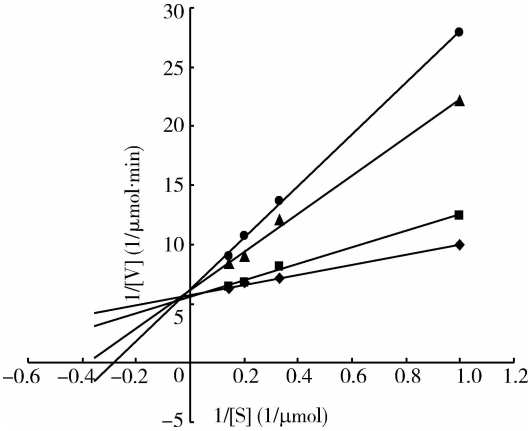


图 3　栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫可溶型海藻糖酶体外抑制 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 3　Lineweaver-Burk plot of *in vitro* inhibition of castanospermine on the soluble trehalase extracted from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

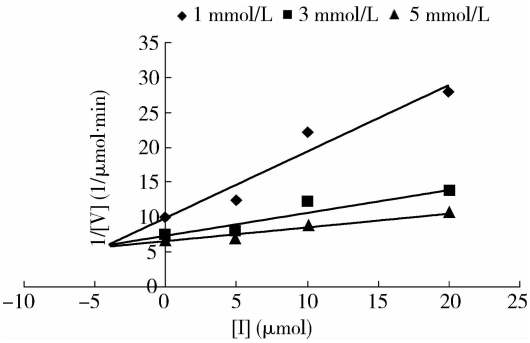


图 4　栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫可溶型海藻糖酶体外抑制 Dixon 图

Fig. 4　Dixon plot of *in vitro* inhibition of castanospermine on the soluble trehalase extracted from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

栗精碱 10 h 后，对棉铃虫幼虫中肠组织可溶型海藻糖酶抑制显著（$P<0.05$）。其中，注射 10 μL 7.5 μmol/L 栗精碱后，中肠组织游离型海藻糖酶活性为 0.197 μmol 葡萄糖/mg pro·min，是对照组活性（0.225 μmol 葡萄糖/mg pro·min）的 87.50%，抑制率为 20.31%；注射 10 μL 15 μmol/L 栗精碱后，中肠组织游离型海藻糖酶活性为 0.166 μmol 葡萄糖/mg pro·min，抑制率为 33.02%；注射 10 μL 30 μmol/L栗精碱后，中肠组织游离型海藻糖酶活性为 0.158 μmol 葡萄糖/mg pro·min，抑制率为 36.00%。注射不同浓度栗精碱胁迫 5 龄棉铃虫 20 h 后，其中肠可溶型海藻糖酶活性被显著抑制（$P<0.05$），但与 10 h 相比这种变化不显著（$P>0.05$）。

**2.3.2**　对血淋巴组织海藻糖影响：栗精碱胁迫 10 和20 h 后，血淋巴组织海藻糖含量和对照组比都显著增加（$P<0.05$）（图 6）。其中注射 7.5，15 和

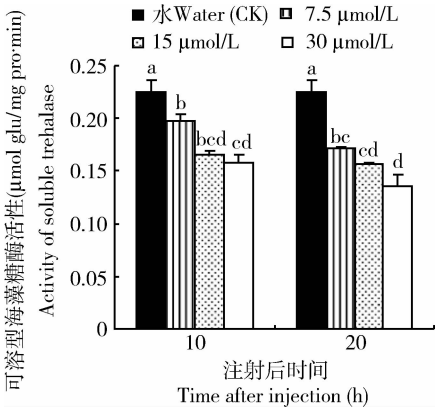


图 5　不同浓度栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶型海藻糖酶活体抑制

Fig. 5　*In vivo* inhibition of castanospermine on midgut soluble trehelase extracted from the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

柱形图上标有不同小写字母的表示经 LSD 检验在 α = 0.05 水平差异显著；下同。Different lowercase letters above bars indicate significant difference at α = 0.05 (LSD). 图 6 和 7 同。The same for Figs. 6 and 7.

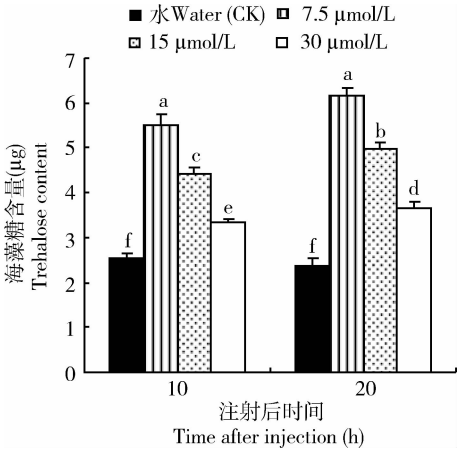


图 6　不同浓度栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫血淋巴海藻糖含量影响

Fig. 6　Trehalose content in the hemolymph of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* after injection of castanospermine in different concentrations

30 μmol/L 栗精碱 10 h 后，血淋巴海藻糖含量和对照组比分别增加了 115.7%，73.2% 和 30.4%。随着注射时间的增长（10 和 20 h），血淋巴海藻糖含量呈显著增加趋势（$P<0.05$）。

**2.3.3**　对血淋巴组织葡萄糖影响：如图 7 所示，注射栗精碱 10 h 后，血淋巴中葡萄糖含量高于对照组（$P<0.05$），并随注射栗精碱浓度的增加而显著降低（$P<0.05$），注射 7.5，15 和 30 μmol/L 栗精碱后

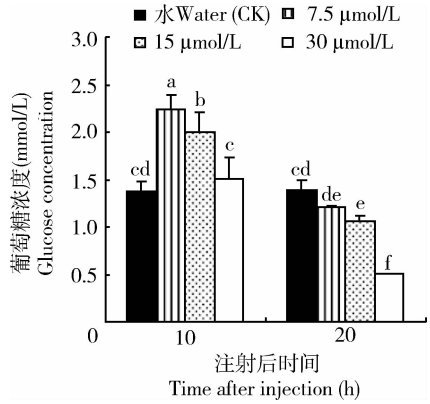


图 7 不同浓度栗精碱对棉铃虫 5 龄幼虫血淋巴葡萄糖含量影响

Fig. 7 Glucose content in the hemolymph of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* after injection of castanospermine in different concentrations

血淋巴葡萄糖含量和对照组比分别增加了 62.7%, 45.6% 和 10.0%。注射栗精碱 20 h 后,血淋巴中葡萄糖浓度都下降到对照水平以下,其中注射 30 μmol/L栗精碱组血淋巴葡萄糖浓度是注射 10 h 后的20.9%;而注射 15 和 10 μmol/L 组分别下降到 10 h 浓度的 48.2% 和 68.4%。

## 3 讨论

海藻糖酶在葡萄糖代谢中的关键地位使其成为控制害虫的重要的靶标酶(Silva *et al.*, 2006)。目前已从多种昆虫中分离纯化出海藻糖酶,并且这个数目还在不断增加(Jin and Zheng, 2009)。

之前的研究显示,对于很多昆虫来说,中肠组织中可溶型海藻糖酶活性显著高于其他组织(于彩虹等, 2013)。从草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和摇蚊 *Chironomus riparius* 幼虫中肠组织纯化得到的可溶型海藻糖酶占到总活性的 90% (Silva *et al.*, 2006)和 62% (Forcella *et al.*, 2010)。而且随着昆虫的生长发育,其对于能量的需求增加,海藻糖酶对调节昆虫的能量代谢起到重要作用(于彩虹等, 2013)。纯化得到的棉铃虫中肠海藻糖酶主要为可溶型。研究表明,纯化得到的昆虫幼虫可溶型海藻糖酶分子量在 60 ~ 70 kDa 之间(Vaandrager *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1993),本研究通过离子交换层析和疏水层析,从棉铃虫中肠纯化得到可溶型海藻糖酶。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量约为 67 kDa,与前人研究基本一致。

在之前的研究中,选用多种植物源化合物,研究其对昆虫海藻糖酶抑制效果,证明了 β-葡萄糖苷类化合物(Silva *et al.*, 2006; 于彩虹等, 2011)和糖苷生物碱(Hirayama *et al.*, 2007)为海藻糖酶抑制剂。本研究选取的栗精碱为一种糖苷生物碱,通过实验证明栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的竞争性抑制剂(Ki = 4.9 μmol/L),为微摩尔级。和报道过的其余中肠可溶型海藻糖酶竞争性抑制剂相比(李苷:Ki = 0.92 mmol/L;扁桃腈:Ki = 1.14 mmol/L;水扬苷:Ki = 19 mmol/L)(Silva *et al.*, 2006),栗精碱是一种非常有效的抑制剂。栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的抑制中浓度为 7.32 μmol/L,而从桑叶乳汁中提取的拟糖植物碱化合物 DNJ 和 DNB-I 对蓖麻蚕幼虫中肠组织可溶型海藻糖酶抑制中浓度为 45 和 1.9 μmol/L,对家蚕幼虫中肠组织的可溶型海藻糖酶抑制中浓度为 460 和 140 μmol/L (Konno *et al.*, 2006; Hirayama *et al.*, 2007)。

有研究表明,将海藻糖酶抑制剂注射(饲喂)到昆虫体内,中肠海藻糖酶活性下降显著,甚至可致死昆虫(Kono *et al.*, 1993, 1994; Silva *et al.*, 2004)。将栗精碱注射到棉铃虫体内,其中肠海藻糖酶活性随着注射剂浓度的增加而显著下降($P < 0.05$),而不同反应时间(10 和 20 h)酶活性差异不大($P > 0.05$)。研究显示,在大多数昆虫代谢过程中,海藻糖处于一个稳定的循环状态(Saito, 1963),海藻糖酶通过控制海藻糖降解从而维持稳态平衡(Friedman, 1961; Murphy and Wyatt, 1965)。本研究中注射海藻糖酶抑制剂致使血淋巴海藻糖含量持续升高(图 6)。这种变化也可能是由于稳态平衡被破坏的结果。和预期不同的是,在注射栗精碱 10 h 后,血淋巴葡萄糖含量高于对照水平(图 7)。此时血淋巴组织海藻糖含量大量增加,葡萄糖浓度小量增加,由于海藻糖与昆虫抗逆性有着密切关系,这可能是由于在毒物胁迫下,海藻糖的合成速度大于分解速度(Nath, 2002)。在注射栗精碱 20 h 后,血淋巴葡萄糖浓度急剧下降,低于对照水平,从而使棉铃虫能量供给出现障碍。葡萄糖浓度的下降被认为是注射海藻糖酶抑制剂所产生的效果,并且是造成昆虫死亡的原因(Wegener *et al.*, 2003)。我们猜测,注射栗精碱到棉铃虫血淋巴组织中,它随即被吸收到中肠组织中(Santos *et al.*, 1986),抑制中肠组织的海藻糖酶活性,进而阻碍血淋巴海藻糖的分解(Terra and Ferreira, 1994),即葡萄糖一方面被昆虫能量代谢利用而另一方面却无法靠海藻糖水解补

给，从而使血淋巴葡萄糖浓度下降。Hirayama (2007)从桑叶乳胶中提取出拟糖生物碱，研究它对鳞翅目类昆虫蓖麻蚕、家蚕的代谢反应，发现在蓖麻蚕中，拟糖生物碱首先被吸收到中肠组织，抑制蔗糖酶、海藻糖酶活性，阻碍蔗糖、海藻糖的吸收。而家蚕由于长期进化结果，可以通过大量合成蔗糖酶和海藻糖酶来适应桑叶环境，从而对桑叶中的拟糖生物碱不敏感。而栗精碱也并不以海藻糖酶为唯一靶标，它对昆虫体内的蔗糖酶、葡萄糖苷酶等在昆虫能量代谢中起关键作用的酶都有很强的抑制作用(Saul *et al*., 1983)。所以在栗精碱胁迫下，棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶的变化可以认为是一系列生理生化调节后引起的。

本研究论证了栗精碱对棉铃虫幼虫可溶型海藻糖酶活体和离体的抑制情况。研究发现栗精碱可以作为棉铃虫海藻糖酶的一种有效的竞争性抑制剂，为进一步研究海藻糖酶活性位点结构和活性位点化学图谱，以及开发海藻糖酶抑制剂的植物源农药奠定了基础。

## 参考文献（References）


Asano N, Kato A, Matsui K, 1996. Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *Eur. J. Biochem*., 240(3): 692 – 698.

Asano N, Takeuchi M, Kameda Y, Matsui K, Kono Y, 1990. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J. Antibiot*., 43(6): 722 – 726.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*., 72(1): 248 – 254.

Capella AN, Terra WR, Ribeiro AF, Ferreira C, 1997. Cytoskeleton removal and characterization of the microvillar membranes isolated from two midgut regions of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). *Insect Biochem. Molec. Biol*., 27(8): 793 – 801.

Forcella M, Cardona F, Goti A, Parmeggiani C, Cipolla L, Gregori M, Schirone R, Fusi P, Parenti P, 2010. A membrane-bound trehalase from *Chironomus riparius* larvae: purification and sensitivity to inhibition. *Glycobiology*, 20(9): 1186 – 1195.

Friedman S, 1961. Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of *Phormia regina* Meig. *Arch. Biochem. Biophys*., 93(3): 550 – 554.

Hirayama C, Konno K, Wasano N, Nakamura M, 2007. Differential effects of sugar-mimic alkaloids in mulberry latex on sugar metabolism and disaccharidases of Eri and domesticated silkworms: enzymatic adaptation of *Bombyx mori* to mulberry defense. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 37(12): 1348 – 1358.

Hohenschutz LD, Bell EA, Jewess PJ, Leworthy DP, Pryce RJ, Arnold E, Clardy J, 1981. Castanospermine, A 1, 6, 7, 8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid, from seeds of *Castanospermum australe*. *Phytochemistry*, 20(4): 811 – 814.

Jin LQ, Zheng YG, 2009. Inhibitory effects of validamycin compounds on the termites trehalase. *Pestic. Biochem. Physiol*., 95(1): 28 – 32.

Konno K, Ono H, Nakamura M, Tateishi K, Hirayama C, Tamura Y, Hattori M, Koyama A, Kohno K, 2006. Mulberry latex rich in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(5): 1337 – 1341.

Kono Y, Takahashi M, Matsushita K, Nishina M, Kameda Y, Hori E, 1994. Inhibition of flight in *Periplaneta americana* (Linn.) by a trehalase inhibitor, validoxylamine A. *J. Insect Physiol*., 40(6): 455 – 461.

Kono Y, Takeda S, Kameda Y, Takahashi M, Matsushita K, Nishina M, Hori E, 1993. Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool*., 28(3): 379 – 386.

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol*., 14(5): 501 – 508.

Murphy TA, Wyatt GR, 1965. The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. *J. Biol. Chem*., 240(4): 1500 – 1508.

Nath BS, 2002. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol*., 74(2): 73 – 84.

Pan YT, Hori H, Saul R, Sanford BA, Molyneux RJ, Elbein AD, 1983. Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin. *Biochemistry*, 22(16): 3975 – 3984.

Saito S, 1963. Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol*., 9(4): 509 – 519.

Santos CD, Ribeiro AF, Terra WR, 1986. Differential centrifugation, calcium precipitation, and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool*., 64(2): 490 – 500.

Saul R, Chambers JP, Molyneux RJ, Elbein AD, 1983. Castanospermine, a tetrahydroxylated alkaloid that inhibits $\beta$-glucosidase and $\beta$-glucocerebrosidase. *Arch. Biochem. Biophys*., 221(2): 593 – 597.

Scofield AM, Witham P, Nash RJ, Kite GC, Fellows LE, 1995. Castanospermine and other polyhydroxy alkaloids as inhibitors of insect glycosidases. *Comp. Biochem. Physiol*., 112(1): 187 – 196.

Silva MCD, Terra WR, Ferreira C, 2006. Absorption of toxic β-glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem*., 143(3): 367 – 373.

Silva MCP, Terra WR, Ferreira C, 2004. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 34(10): 1089 – 1099.

Su ZH, Sato Y, Yamashita O, 1993. Purification, cDNA cloning and

Northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Gene Structure and Expression*, 1173(2): 217 - 224.

Temesvari LA, Klein G, Cotter D A, 1996. Environmental influence on trehalogenesis in amoebae of the cellular slime molds. *Mycologia*, 88(5): 819 - 830.

Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol B Comp. Biochem.*, 109(1): 1 - 62.

Thompson SN, 2003. Trehalose-the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.*, 18(3): 205 - 285.

Trugnan G, Rousset M, Zweibaum A, 1986. Castanospermine: a potent inhibitor of sucrase from the human enterocyte-like cell line Caco-2. *FEBS Lett.*, 195(1): 28 - 32.

Vaandrager S, Haller TB, Van Marrewijk WJA, Beenakkers AMT, 1989. Fractionation and kinetic properties of trehalase from flight muscles and haemolymph of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 19(1): 89 - 94.

Walker BD, Kowalski M, Goh WC, Kozarsky K, Krieger M, Rosen C, Rohrschneider L, Haseltine WA, Sodroski J, 1987. Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(22): 8120 - 8124.

Wegener G, Tschiedel V, Schlöder P, Ando O, 2003. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J. Exp. Biol.*, 206(7): 1233 - 1240.

Winchester B, Fleet GW, 1992. Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology*, 2(3): 199 - 210.

Yu CH, Huang Y, Lin RH, Jiang H, Wang WT, Pei L, 2013. Comparative tests of soluble trehalase activities of five insects. *Plant Protection*, 39(4): 5 - 9. [于彩虹, 黄莹, 林荣华, 姜辉, 王文涛, 裴力, 2013. 五种昆虫可溶性海藻糖酶活性比较. 植物保护, 39(4): 5 - 9]

Yu CH, Liang XH, Lu D, Wang XJ, Jiang H, Lin RH, 2011. Trehalase activity and carbohydrate content of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in response to several botanical compounds. *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 41 - 49. [于彩虹, 梁晓贺, 卢丹, 王晓军, 姜辉, 林荣华, 2011. 几种植物源化合物对棉铃虫海藻糖酶活性及相关碳水化合物含量的影响. 昆虫学报, 54(1): 41 - 49]

(责任编辑: 袁德成)